

겨우살이 Lectin이 흰쥐의 혈청지질 및 간조직에 미치는 영향

Effects of Serum Lipid and Liver Tissue on Rats in Lectin from *Viscum Album*(Mistletoe)

장철수, 류재기
김천대학교 임상병리학과

Chul-Soo Jang(changcs@gimcheon.ac.kr), Jae-Ki Ryu(rs0429@hanmail.net)

요약

본 연구에서 국내산 겨우살이 lectin이 흰쥐 간의 지방형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 내 지질 함량을 측정하였고, 이를 확인하고자 간조직의 지방형성 변화를 조사하였다. 렉틴의 분리는 sephadex G-150로 여과 및 sepharose 4B affinity chromatography 로 정제하였다. CCl₄를 복강 내에 투여시 72 시간 경과 후 혈청 총cholesterol 및 triglyceride는 정상군 및 olive oil 투여군에 비해 유의하게 증가하였으며, lectin과 CCl₄를 동시 투여 하였을 때는 유의한 감소를 나타내었다. 흰쥐 간의 조직학적 관찰은 CCl₄ 투여군은 정상군 및 olive oil 투여군에 비해 지방변화 및 간세포 내에 많은 대소의 cytoplasmic vacuole가 보였으나, CCl₄와 lectin을 동시 투여시는 CCl₄ 투여군에 비해 cytoplasmic vacuole은 현저히 감소하였고, 이에 비례하여 혈청 cholesterol 및 triglyceride 측정치가 현저히 감소하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 볼때 흰쥐에서 lectin이 혈청 지질을 감소시키거나 또는 조직학적 관찰에서 간조직의 지질형성을 억제시키는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

■ **중심어** : | 겨우살이 | 렉틴 | 혈청지질 | 간조직 |

Abstract

This study was carried out to investigate effect of serum lipid and liver tissue in lectin from *Viscum album* on rats. The lectin was purified by sepharose 4B affinity chromatography and gel filtration using sephadex G-150 with plant material from *Viscum album*. After 72 h of CCl₄ injection, there was a significant increase in serum total cholesterol and triglyceride levels relative to the control group. However, treatment of both *Viscum album* and purified lectin were significantly decreased lipid parameters against the CCl₄-induced. Histological observation of the liver section of rats challenged with CCl₄ produced a marked increase of cytoplasmic vacuoles in number, while rats administered olive oil alone did not alter the normal hepatic architecture. Histological observation of the liver section in rats treated 72 h with either *Viscum album* purified lectin or CCl₄-induced liver lipogenesis showed decreased numbers of cytoplasmic vacuoles and necrotic cells. These results suggest that *Viscum album* lectin has a significantly decreased lipid in serum or histological observation of the liver section decreased in lipogenesis in rats.

■ **keyword** : | *Viscum Album* | Lectin | Serum Lipid | Liver Tissue |

I. 서론

Lectin은 Boyd에 의해 처음 사용되었으며, 이는 당 특이성을 가진 단백질로 적혈구를 응집시키는 특성으로 인해 hemaagglutinine이라고도 한다[1][2]. 이 lectin은 세포를 응집시키는 능력을 지닌 단백질로 주로 식물의 씨앗에서 발견되나 그 외 뿌리, 잎, 줄기와 여러 생물에서 다양하게 발견되는데, 이는 표면에 효소작용이 없으며 항체도 아닌 단백질로 단당류나 올리고당 구조를 인지, 결합하는 단백질로 알려져 있다[3][4].

Lectin에 관한 연구는 1888년 Stillmark가 아주까리 (*Ricinus communis*)로 부터 ricin을 분리 이 추출물이 적혈구를 응집시키는 효과를 발견하면서 부터 식물과 동물로 부터 많은 lectin이 분리되었고 이들은 각각 고유의 특이성을 가지며 여러 가지 생리작용을 하고 있음이 밝혀졌다[5]. 오늘날 100여종의 많은 lectin이 정제되고 상품화되어 있으며 이를 이용하여 세포막 구조연구, 세포분열 연구, 면역반응 작용, 항균효과, 인슈린 유사 효과 등 임상적 질환과 암세포의 성장 억제작용을 보이는 항암제 연구가 진행 중에 있다[6-10]. Lectin에 관한 연구를 위하여 사용한 겨우살이(*Viscum album*)는 기생식물로 아프리카, 유럽, 아시아 등 전 세계적으로 널리 분포하며 약용 및 식용자원으로 이용되었으며 여러 질환의 만병치료제로 널리 사용되어 왔다[11]. 이 같은 약리효과는 lectin에 의한 것이며 이를 이용한 연구와 치료제 개발을 위한 가능성을 위해 많은 연구가 진행 중에 있다[12][13].

겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)는 국내에서 한방 및 민간요법으로 잎, 줄기를 향암, 항균, 항바이러스, 강심효과, 동맥경화 등의 약제로 사용하고 있으나[14-16], 과학적 근거는 없는 실정으로 아직 이를 이용한 생리학적 연구는 미흡한 실정이다. 그동안 본 연구자는 한방의 과학화, 약용식물의 자원화와 새로운 치료제의 개발을 위한 일환으로, 이미 국내산 겨우살이에 대한 연구를 위해 이를 생화학적으로 분리 정제 하였으며[17], 그 추출물 및 정제물이 당뇨를 유발시킨 고혈당증에 혈당상승 억제 효과가 있는 것으로 보고 하였으며[18], 손상된 간세포에서 독성의 영향을 조사하였

다[17].

본 연구에서는 국내산 겨우살이가 동맥경화의 질병에서 한방, 민간요법의 치료제로 사용하는 바[14], 이를 규명하고자, carbon tetrachloride로 고지혈증을 유발시킨 후 lectin이 간의 지방형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 내 지질 함량을 측정하였고, 이를 확인하고자 간조직의 지방형성 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 겨우살이는 덕유산 백련사 부근에서 10~12월에 채취한 후, 동결 저장하였다가 사용하였다.

2. Lectin의 제조

Lectin의 추출을 위하여 겨우살이 100 g을 액체질소를 사용하여 분쇄하고, 0.15 M NaCl을 가하여 교반 후, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이어서 (NH₄)₂SO₄ (60 g/100 ml)을 첨가하여 용해시킨 후, 현탁액을 원심분리하였고, 이를 냉동건조기를 사용하여 건조시켰다.

Lectin의 정제를 위하여 sepharose를 이용한 affinity chromatography를 이용 실시하였고, sephrose 4B affinity chromatography에서 정제한 시료를 sephadex G-150 column (Pharmacia. 2.8×60 cm)에 주입하고, 이를 각각의 파장 280 nm에서 흡광도 및 lectin 활성능을 측정하였고 활성이 있는 분획을 모아 투석하고 냉동건조 하였다[15]. 추출 및 정제된 lectin의 정제단계별 순도를 검정하고자 HPLC 및 PAGE를 이용한 전기영동법을 사용하였으며, 이때 전기영동은 7.5% polyacrylamide gel을 사용하였다[18].

3. CCl₄에 의한 고지혈증 유도

CCl₄ 투여로 인한 간 지방형성을 유도하기 위해 lectin의 영향을 검토하기 위하여 숫 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 150 g 내외의 같은 조건 하 6 마리씩을 각 군별로 나누어 2 주간 적응화시켰다.

정상군은 CCl₄를 투여하지 않았으며, 대조군은 olive

oil 투여하였다. 실험군은 다시 CCl_4 투여군, lectin 투여군과 lectin과 CCl_4 병행 투여군으로 나누었다.

간 지방형성을 유도하기 위해 CCl_4 와 olive oil의 1:1(v/v)혼합액을 Lin 등[20]의 방법에 따라 체중 kg 당 2 ml를 복강 내 주사하고 48 시간 후 반복하여 주사하였다. 이때 CCl_4 투여 1시간 전 겨우살이 추출물 및 lectin을 각각 1 mg, 0.2 mg을 동시에 2 회 투여하였고 대조군으로 olive oil, lectin 투여군도 같은 방법으로 실시하였다. 이들정상군과 대조군과 실험군은 마지막 주사한 다음 24 시간 절식시킨 후 처치하였다.

4. 지질농도 측정

Cholesterol ester는 cholesterol esterase에 의해 free cholesterol로 분해되며, 이것이 COD(Cholesterol oxidase)에 의해 산화되어 H_2O_2 및 Δ^4 -cholestenon을 생성한다. 이때 H_2O_2 는 POD(Peroxidase)에 의해 phenol과 4-aminoantipyrine을 산화축합시켜 quinon색소를 비색하는 cholesterol enzyme법을 이용하여 측정하였다.

Triglyceride는 LPL(Lipoprotein lipase)에 의해 가수분해되어 생성되는 glycerol을 ATP(Adenosine triphosphate) 존재 하에서 GK(Glycerol kinase)에 의해 G-3-P (Glycerol-3- phosphate)를 생성하고 이를 GPO (Glycerolperoxidase)로 산화시켜 생성되는 H_2O_2 에 POD를 작용시켜 phenol과 4-aminoantipyrine을 산화축합시켜 quinon색소를 비색하는 법으로 아산제약 kit를 사용하였다.

5. 조직학적 관찰

간조직의 일반적인 형태학적 변화는, 대조군, CCl_4 투여군, lectin 단독 투여군과 lectin 및 CCl_4 병행 투여군으로 나누어 관찰하였다. 이들 각 군에서 간의 중엽을 떼어내 즉시 10% 포르말린에 고정시켰다. 간조직은 고정, 탈수, 투명, 파라핀침투, 포매 후 블록을 제작하였고 이를 미세한 두께로 절편하였고 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 광학현미경으로 간세포내의 대소의 공포(vacuole) 지방변성 여부를 관찰 하였다.

6. 유의성 검정

각 실험결과에 대한 통계처리는 Student's t-test[22]로 하였으며 실험치의 표현은 Mean±SD로 하였고, p-value가 최대치 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

겨우살이(*Viscum album* L. var. *coloratum* Ohwi)는 참나무, 뽕나무, 사과나무 등을 숙주로 성장하는 반기생 식물로 여러나라에서 오래 전부터 민간요법에서 치료를 목적으로 한 약용으로 널리 사용되어 왔다. 겨우살이 자체가 가진 독성이 메스커움, 정신적 착란, 경련, 발작을 일으키므로 취급에 장애가 되고 있으며 이 독성이 의학적인 가치를 가진 당단백질의 일종인 lectin으로 보고되고 있으며 이를 이용한 많은 분리 정제 및 생물의학적 연구가 활발히 진행되고 있다[8][13].

Lectin은 식물의 종자와 뿌리, 잎, 달팽이같은 무척추 동물이나 어류와 같은 척추동물, 미생물 등에서도 발견된다. 과거에는 주로 식물에서 분리 정제되어 왔으나 현재는 미생물 등 수많은 동물로부터도 분리되고 있으며, 이들은 분자량이나 subunit, 생물학적, 화학적, 면역학적 성질과 기능이 다양하게 나타나고 있다[2].

식물에서도 이미 800여종 이상의 lectin이 발견되었고 이중 100여 종이 이미 분리 정제되어 실용화되고 있으며 분리 정제 방법도 다양하다. Lectin의 분리는 염용액을 이용하여 추출하고 이렇게 얻은 crude lectin을 sepharose 4B affinity chromatography를 이용한 방법으로 정제 하였다[15]. 그러나 아직까지 lectin은 자연 동식물 등에서만 분리 되므로 추출 및 정제에서 수율을 높이는 획기적인 방법은 아직 없는 실정이므로 이에 대한 적절한 연구는 물론 인공적으로 합성하거나 또는 대량 생산이 가능한 방법으로서의 연구가 적절하다고 생각된다. 또한 본 연구자는 lectin이 갖는 임상적 약리효과를 확인하고자 인슐린유사 활성을 조사한 바 있다. 이를 위해 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에 겨우살이 추출물 및 정제된 lectin을 경구 및 복강 내에 투여하였다. Streptozotocin에 의한 췌장의 손상은 혈당

및 요당을 측정함으로써 알 수 있었으며, 겨우살이 추출물의 경구 투여시 항당뇨 효과는 투여 전에 비해 혈당치가 현저히 감소하였으므로 항당뇨 효과가 있음을 보고 하였다[18]. 또한 CCl₄로 처리한 손상된 간세포에서 lectin의 세포 독성 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다[19].

국내산 겨우살이가 동맥경화, 심장질환 등의 질병에서 한방 및 민간요법 치료제로 사용하고 있으므로, 이를 규명하고자, CCl₄(Carbon tetrachloride)로 고지혈증을 유발시킨 후, lectin을 투여하여 이들의 영향을 알아보기 위해 혈청 내 지질 함량을 측정하였고, 확인하고자 간조직의 지방형성 변화를 조사하였다. 정상 흰쥐에 CCl₄를 투여하면 간의 지방형성을 촉진시키며, 혈청 중 lipoprotein 및 cholesterol 치가 증가한다고 보고 되고 있다[24-26]. 그러므로 CCl₄ 투여로 고지혈증을 유도한 후에 lectin의 영향을 조사하고자 CCl₄를 복강 내에 주사하여 72 시간 경과시킨 후 혈청 총cholesterol 및 triglyceride를 측정하였다[Table 1].

Table 1. Total cholesterol and triglyceride levels in rats serum of at 72 hrs after administration of CCl₄,Viscum album purified lectin

Group	Injected amount (mg/kg)	Total cholesterol (mg/100mL)	Triglyceride (mg/100mL)
Normal	-	66±6.1	55±13.2 ^{a)}
Olive oil	2	69±33.0	53±9.1
CCl ₄ /olive oil	2	113±22.0***	163±24.0
Purified lectin	0.4	68±3.7	59±14.0

a) Each value represents the mean±SD; n=6 rats per group. ***p<0.05; Statistically significant compared with the data of normal group(Student's t-test).

총cholesterol 함량은 대조군 66±6.1mg/100mL, olive oil처리군 69±33.0 mg/100mL로 CCl₄/olive oil 처리군에서 113±22.0 mg/100mL 증가하였고, triglyceride는 대조군 55±13.2mg/100mL, olive oil처리군 53±9.1 mg/100mL로 CCl₄/olive oil 처리군에서 63±24.0 mg/100mL로 증가로, CCl₄ 투여군은 정상군 및 olive oil 투여군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.05).

또한 lectin의 복강내 투여했을 때, 총cholesterol 함량은 대조군 66±6.1 mg/100mL, lectin(4mg/kg) 처리군

68±3.7 mg/100mL, triglyceride 함량은 대조군 55±13.2 mg/100mL, lectin처리군 59±14.0 mg/100mL로, 정상군 및 lectin 처리군에서 cholesterol 및 triglyceride 측정치가 약간 증가하였으나 유의성은 보이지 아니하였다.

Lectin과 CCl₄를 동시 투여 하였을 때 총cholesterol 함량은 CCl₄ 단독 투여시 113±12.0 mg/100mL, 동시 투여시 74±5.0 mg/100mL, triglyceride 함량은 CCl₄ 단독 투여시 163±24.0 mg/100mL 동시 투여시 114±19.0 mg/100mL로 단독 투여시 보다 동시 투여시 총cholesterol 함량 및 triglyceride 함량이 약 34%나 유의한 감소를 나타 내었으므로 이는 lectin이 혈액 고지혈증에 대해 지질 억제능력이 있음을 확인 할 수 있는 것으로 사료 된다[Table 2].

Table 2. Effect of Viscum album purified lectin on total cholesterol and triglyceride levels in rats serum induced by CCl₄

Group	Injected amount (mg/kg)	Total cholesterol (mg/100mL)	Triglyceride (mg/100mL)
CCl ₄ /olive oil	-	113±12.0	163±24.0 ^{a)}
CCl ₄ +Purified lectin	0.4	74±5.0***	114±19.0

a) Each value represents the mean±SD; n=6 rats per group. ***p<0.05; Statistically significant compared with the data of CCl₄/olive oil group(Student's t-test).

흰쥐 간의 조직학적 관찰은 정상군 및 olive oil 투여군에서 간세포 및 sinusoid가 중심정맥과 portal triads를 따라 잘 보존되어 있었고 세포질도 잘 형성되어 구조적인 차이점은 없었다[Fig. 1]-A. B.

간은 전신적 지방대사의 중추기관이며, 지방의 출입이 활발하다. 또한 산소결핍에 극히 예민하며, 간내 혈액순환의 말초에 해당하는 소엽 중심대의 간세포는 산소결핍, 울혈, 증독 등에 의해 나타나는 지방변성을 일으키고, 소엽 주변대에 비교적 큰 지방방울이 나타나 지방침윤이 발생한다. 이 지방침윤이 고도화되면 지방침착은 간 전체로 파급되고 지방방울이 간 전체에 충만 된다.

조직학적으로 관찰한 결과, CCl₄ 투여군은 정상군 및 olive oil 투여군에 비해 지방변화로써 간소엽 중심대의 간세포 내에 많은 대소의 cytoplasmic vacuole가 보였

다. 간세포의 핵은 한쪽으로 치우쳐 있고 세포체는 종대되었으며, 지방은 헤마톡실린-에오신염색 표본에서 용해되어 cytoplasmic vacuole로 나타났다 [Fig. 1]-C.

CCl₄와 lectin을 동시 투여시는 CCl₄ 투여군에 비해 cytoplasmic vacuole은 현저히 감소하였고, 이에 비례하여 혈청 cholesterol 및 triglyceride 측정치가 현저히 감소하는 결과를 나타내었다[Fig. 1]-D.

이상의 결과를 볼때 lectin이 혈액 고지혈증에 대해 지질을 감소시키거나 또는 조직학적 관찰에서 간조직의 지질형성을 억제시키는 효과가 있는 것으로 확인되었으므로 지방간 치료제 또는 유사한 질병에 대한 치료제로서의 가능성을 확인하였으며, 앞으로 이와 관련된 정확한 기전은 물론 다른 치료제로서의 가능성을 위해 더욱 연구 진행되어야 할 것으로 사료된다.

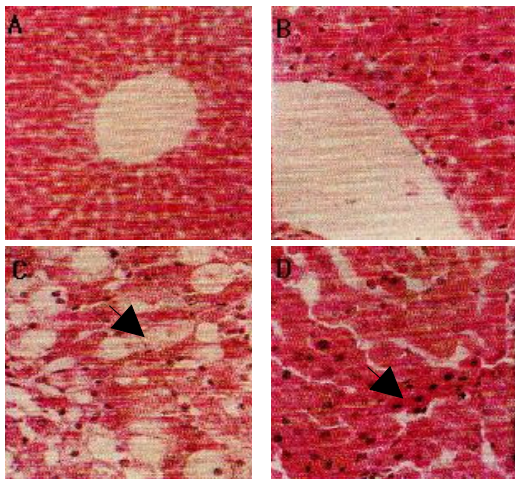


Fig. 1. Sections of rat liver.

A; Normal control group(HE stain, 100X).
 B; Control group (olive oil only), the hepatic cell pattern was the same normal control group and control group. C; Abnormal control group(CCl₄ only); abnormal control group (CCl₄/olive oil, 4 mL/kg) caused 72 hrs after administration of CCl₄. Inflammatory cells and cytoplasmic vacuole were marked. D: Histological observation of liver in rats treated 72 hrs with either Viscum album purified lectin with lipogenesis induced by CCl₄, that showed decrease numbers of cytoplasmic vacuole than CCl₄ only.(HE stain, 400X)

참고 문헌

- [1] W. C. Boyd and E. Shapleigh, Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectin), Science, Vol.119, pp.419, 1954.
- [2] N, Sharon and H. Lis, Lectins Cell- agglutinating and sugar- specific proteins, Science, Vol.177, pp.9, 1994.
- [3] L. Lucy and I. J. Goldstein, Protein- Carbohydrate interaction, The journal of biochemistry, Vol.243, No.8, pp.2003-2007, 1968.
- [4] H. Dedray, J. M. Wieruszkeski, and G. Strecker, Structural analysis of the carbohydrate chains isolated from mistletoe (Viscumalbum) lectin, Carbohydrate Research, Vol.236, pp.135-143, 1992.
- [5] W. C. Boyd, The lectin. Their present status, Vox sang, Vol.8, pp.1-32, 1963.
- [6] M. M. Burger and A. R. Goldberg, Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces, Proc. Natl. Acad, Vol.57, pp.351-354, 1967.
- [7] G. L. Nicolson, The interaction of lectins with animal cell surfaces, Int. Rev. Cytology, Vol.39, pp.89-190, 1974.
- [8] A. Pihl, W. Fodstad, and S. Olsnes, Anti-cancer properties of the toxic lectins abrin and ricin, in protides of the biological fluids 27th colloquium. Peeters, H. ed. Pergamon Press, Oxford, Vol.12, pp.631-636, 1979.
- [9] W. C. Greene and T. A. Waldman, Inhibition of human lymphocyte proliferation by the nonmitogenic lectin wheat germ agglutinin, J. Immunology, Vol.124, pp.2979, 1980.
- [10] K. O. David and J. Bikomo, Anti diabetic properties of the african mistletoe in streptozotocin-induced diabetic rats, J. Ethnopharma, Vol.43, pp.13-17, 1994.

- [11] P. Griggs, Mistletoe, myth magic and medicine, The Biochemistry, Vol.13, pp.3-4, 1991.
- [12] L. Paine and H. Harrison, Mistletoe: Its role in horticulture and human life, Hort Technology, Vol.2, pp.324-329, 1992.
- [13] E. Kafaru, Mistletoe : an example of all purpose herb. The Guardian (Nigeria), Vol.9, pp.16-17, 1993.
- [14] T. J. Kim, *Korean resources plants(1)*, Seoul University Press, pp.140-141, 1996.
- [15] I. Siegle., P. Fritz, M. McClellan, S. Gutzeit and T. E. Murdter, Combined cytotoxic action of Viscum album agglutinin-1 and anticancer agents against human A 549 lung cancer cells. Anticancer Res, Vol.21, No.4A, pp.2687-2691, 2001.
- [16] A. Karagoz, E. Onay, N. Arda, and A. Kuru, Antiviral potency of mistleto extracts against human parainfluenza virus type 2 in Vero cells. Phytother. Res. Vol.17, No.5, pp.560-562, 2003.
- [17] C. S. Chang, M. J. Oh, and K. S. Roh, Purification and biochemical characterization of lectin from Viscum album, Korean J. Biotechnol. Bioeng, Vol.14, pp.578-584, 1999.
- [18] C. S. Chang and K. S. Roh, Anti-diabetic effect of Viscum album lectin, Korean J. Biomed. Lab. Sci, Vol.6, pp.151-157, 2000.
- [19] C. S. Chang, J. K. Ryu, and T. H. Kim, The cytotoxicity of rat hepatocytes on Viscum album lectin, Korean Soc. Clin. Lab. Sci., Vol.39, pp.190-195, 2007.
- [20] B. J. Davis, Disc electrophoresis II, Ann. N. Y. Acad. Science, Vol.121, pp.404-427, 1964.
- [21] C. C. Lin, J. M. Lin, C. H. Chang, M. Hattori, and T. Namba, Pharmacological studies on the crude drug Hwang-Jin-Guey' from taiwan (I), Phytotherapy research, Vol.8, pp.193-200, 1994.
- [22] W. C. Schfler, *Statistics for the biological sciences*, Addison-Wesley Publishing Com, USA. 1980.
- [23] A. K. Allen, A. Neuberger and N. Sharon, The isolation of lectins on acid-treated agarose, Carbohydrate Research, Vol.50, pp.121-131, 1972.
- [24] R. O. Recknagel and A. K. Ghoshal, Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity, Labo. Investigation, Vol.15, pp.132-137, 1966.
- [25] R. O. Recknagel, Carbon tetrachloride hepatotoxicity, Pharmacol. Reviews, Vol.19, pp.145-147, 1967.
- [26] J. W. Wakasugi, K. Katami, T. Ikeda, and M. Tomikawa, Action of malotilate on reduced serum cholesterol level in rats with carbon tetrachloride-induced liver damage, Japan J. Pharmacology, Vol.38, pp.391-401, 1985.

저 자 소 개

장 철 수(Chul-Soo Jang)

정회원



- 1984년 2월 : 한양대학교 생물학과(이학석사)
- 1995년 2월 : 계명대학교 생물학과(이학박사)
- 현재 : 김천대학교 임상병리학과 교수

<관심분야> : 임상병리학, 독성학

류 재 기(Jae-Ki Ryu)

정회원



- 1996년 2월 : 건국대학교 미생물공학과(공학석사)
- 1995년 2월 : 계명대학교 생물학과(이학박사)
- 현재 : 김천대학교 임상병리학과 교수

<관심분야> : 병원미생물학, 임상병리학